



Eur päisches Patentamt  
European Patent Office  
Offic eur péen des br v ts



(11) Numéro de publication : **0 658 566 A1**

(12)

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt : **94402879.4**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup> : **C07H 21/00, B01J 19/00**

(22) Date de dépôt : **14.12.94**

(30) Priorité : **16.12.93 FR 9315164**

(43) Date de publication de la demande :  
**21.06.95 Bulletin 95/25**

(84) Etats contractants désignés :  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC  
NL PT SE**

(71) Demandeur : **GENSET**  
**1, rue Robert et Sonia Delaunay**  
**F-75011 Paris (FR)**

(72) Inventeur : **Chatelain, François**  
**1940 Mount Vernon Court, Appt 12**  
**Mountain View, CA 94040 (US)**  
Inventeur : **Kumarev, Viktor**  
**18 avenue de Lespinasse**  
**F-93250 Villemonble (FR)**

(74) Mandataire : **Warcoin, Jacques et al**  
**Cabinet Régimbeau,**  
**26, avenue Kléber**  
**F-75116 Paris (FR)**

(54) **Procédé de préparation de polynucléotides sur support solide et appareil permettant sa mise en oeuvre.**

(57) La présente invention concerne un procédé de préparation de polynucléotides sur support solide dans un réacteur en forme de colonne à travers laquelle on fait circuler les solutions de réactifs et/ou solvants, caractérisé en ce que la phase solide constituant ledit support solide est immobilisée dans ledit réacteur, et lesdites solutions migrent dans la colonne et à travers la phase solide selon une progression frontale, de sorte que les solutions successives de chaque étape d'un cycle de synthèse ne se mélangent pas ou peu.

La présente invention a également pour objet un réacteur constitué par une colonne entièrement remplie par des particules de matériaux poreux constituant le support solide, et un dispositif de synthèse incluant un tel réacteur.

**EP 0 658 566 A1**

Jouve, 18, rue Saint-Denis, 75001 PARIS

La présente invention concerne un procédé de préparation de polynucléotides sur support solide. La présente invention concerne également un réacteur contenant un support solide et un dispositif incluant ce réacteur utiles dans le procédé de préparation de polynucléotides selon l'invention.

La synthèse de polynucléotides sur support solide est particulièrement utilisée dans les synthèses automatisées d'oligonucléotides d'ADN ou ARN. Dans la présente demande, on entend par "polynucléotides" des fragments d'acides désoxyribonucléiques ou d'acides ribonucléiques, ou, plus généralement, des polynucléotides ou oligonucléotides où les bases, liés par des phosphates inter-nucléotidiques, ou encore les cycles riboses des bases, peuvent être modifiés chimiquement de façon connue. Il peut s'agir notamment d'oligonucléotides d'anoméries  $\alpha$  ou  $\beta$ , d'oligonucléotides de lien internucléotidique du type phosphorothioate ou méthylphosphonate, ou encore d'oligothionucléotides.

Le but de l'invention est l'amélioration des performances des méthodes existantes de synthèse d'oligonucléotides.

La méthode selon la présente invention consiste en une modification des appareils et paramètres de la synthèse organique afin d'en améliorer la productivité.

Les améliorations s'exercent, en particulier, sur la durée et les consommations de réactifs nécessaires à l'exécution d'une synthèse.

Le principe de la synthèse chimique des acides nucléiques sur support solide est, aujourd'hui, largement décrit dans la littérature spécialisée, et un certain nombre d'appareils sont disponibles sur le marché qui exécutent automatiquement tout ou partie des étapes de la synthèse. Parmi les voies chimiques décrites, seule la méthode dite des phosphoramidites (*Caruthers et col* : EP 0 035 719 B1) présente à ce jour une efficacité suffisante pour envisager la production à l'échelle industrielle des acides nucléiques.

La préparation d'oligonucléotides ou de polynucléotides est réalisée dans un réacteur contenant un support solide et comprend le traitement du support solide tel qu'un support polymérique inorganique par une série d'étapes successives, chacune des séries conduisant à l'addition d'un nouveau nucléotide sur le support. Les séries d'étapes successives, ou cycles de synthèse, sont effectuées autant de fois que le nécessite la fabrication d'un oligonucléotide ou d'un polynucléotide de longueur souhaitée.

Dans un procédé de synthèse de polynucléotides sur support solide, le support solide est constitué traditionnellement des billes de verre à porosité contrôlée (CPG) ou, plus généralement, de particules d'un polymère minéral ou organique fonctionnalisé.

Les techniques classiquement mises en oeuvre impliquent l'utilisation de huit réactifs différents comme supports solides, constitués par ledit polymère minéral ou organique fonctionnalisé, lié à un nucléoside A, T, C, G, ou U, selon que la séquence à préparer comporte comme premier déoxyribo- ou ribonucléotide A, T, C, G, ou U. Les constructeurs fournissent donc des réacteurs où l'un de ces nucléosides a été préalablement attaché au support. Selon que la séquence commence par A, T, C, G, ou U, on choisit donc le réacteur approprié. L'élongation de ce premier nucléoside se fait ensuite dans le sens  $3' \rightarrow 5'$ , ou  $5' \rightarrow 3'$ , grâce à des réactifs de couplage.

De nombreux supports ont déjà été décrits dans la littérature pour la synthèse en phase solide d'oligonucléotides.

On cite des polymères organiques tels que polystyrène (*Nucleic A. Res.* 1980, volume 8), la polyacrylamide, l'acryloylmorpholide, le polydiméthylacrylamide polymérisé sur kieselguhr (*Nucleic Ac. Res.* 9(7) 1691(1980)).

D'autres supports décrits sont de nature inorganique, en particulier à base de silice fonctionnalisée par un radical hydrocarboné portant un groupe  $\text{NH}_2$  et/ou  $\text{COOH}$  (*J.A.M. Chem.*, 105, 661 (1983), ou le support à base de silice fonctionnalisée par un groupement 3-aminopropyltriéthoxysilane dont l'utilisation en synthèse phosphite et phosphoramidite pour la préparation d'oligonucléotides a été décrite pour la première fois dans le brevet européen n° 0035719.

Il est connu, dans les demandes de brevet en France FR 93 08498, et PCT/FR94/00842 un procédé de synthèse d'oligonucléotides en phase solide dans lequel on utilise un support dit "universel", c'est-à-dire un support solide que l'on peut utiliser quel que soit le premier nucléotide de l'ARN ou l'ADN à synthétiser, quel que soit le type de réactif monomère utilisé pendant la synthèse, c'est-à-dire quel que soit le type de substitution sur le groupement phosphate en  $3'$ , ou en  $5'$  selon que l'on fait la synthèse dans le sens  $5' \rightarrow 3'$ , ou  $3' \rightarrow 5'$ .

En particulier, on peut obtenir l'"universalité" des supports en phase solide grâce à une fonctionnalisation du polymère minéral ou organique avec un radical hydrocarboné comportant des groupes du type glycol dans lesquels un groupe OH et un groupe nucléophile se trouvent en position vicinale, c'est-à-dire sur deux carbones adjacents, à l'extrémité du radical hydrocarboné, ces deux carbones pouvant être éventuellement substitués par des groupes inertes. On entend ici par "groupe inerte" un groupe qui ne réagit pas dans les conditions rencontrées lors des différentes étapes de la synthèse sur support solide d'acides nucléiques selon l'invention.

Dans un mode de réalisation particulier, un procédé de synthèse de polynucléotides comprend les étapes

suivantes d :

1) condensation du group OH en 5' ou 3' du premier nucléotide ou d'un oligonucléotide relié à son autre extrémité 3' ou 5' au dit support solide, à l'aide d'un agent de couplage, avec le groupement phosphate éventuellement substitué respectivement en position 3' ou 5' d'un réactif monomère nucléotidique protégé

2) oxydation ou sulfuration du lien internucléotidique du type phosphite obtenu à l'étape 1) en un lien phosphate respectivement.

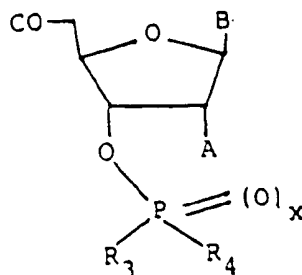
3) déprotection de l'extrémité 5'-O ou 3'-O du produit obtenu à l'étape 2);

4) répétition des étapes 1) à 3) autant de fois que de nucléotides à ajouter pour synthétiser l'acide nucléique.

Les étapes ci-dessus conduisent à un oligonucléotide relié au support solide. Le procédé comporte une étape finale de décrochage de l'acide nucléique du support et élimination des groupes protecteurs des bases et, le cas échéant, des positions 2'-O de l'acide nucléique.

Dans les techniques où le support solide est déjà relié à un premier nucléoside correspondant au premier nucléotide de la séquence à préparer, avant le commencement des cycles de synthèse, ledit support comporte en général une protection en 5' ou 3' dudit nucléoside. Dans ce cas, le cycle de synthèse commence par une étape de déprotection en milieu acide, en général une détrylation.

Selon les variantes les plus couramment utilisées, ledit réactif monomère nucléotidique répond à la formule :



dans laquelle :

- A représente H ou un groupement hydroxyle éventuellement protégé,
- B est une base purique ou pyrimidique dont la fonction amine exocyclique est éventuellement protégée,
- C est un groupe protecteur conventionnel de la fonction 5'-OH,
- x = 0 ou 1 avec

a) lorsque x = 1 :

- . R<sub>3</sub> représente H et R<sub>4</sub> représente un atome d'oxygène chargé négativement, ou
- . R<sub>3</sub> est un atome d'oxygène et R<sub>4</sub> représente soit un atome d'oxygène, soit un atome d'oxygène porteur d'un groupe protecteur, et

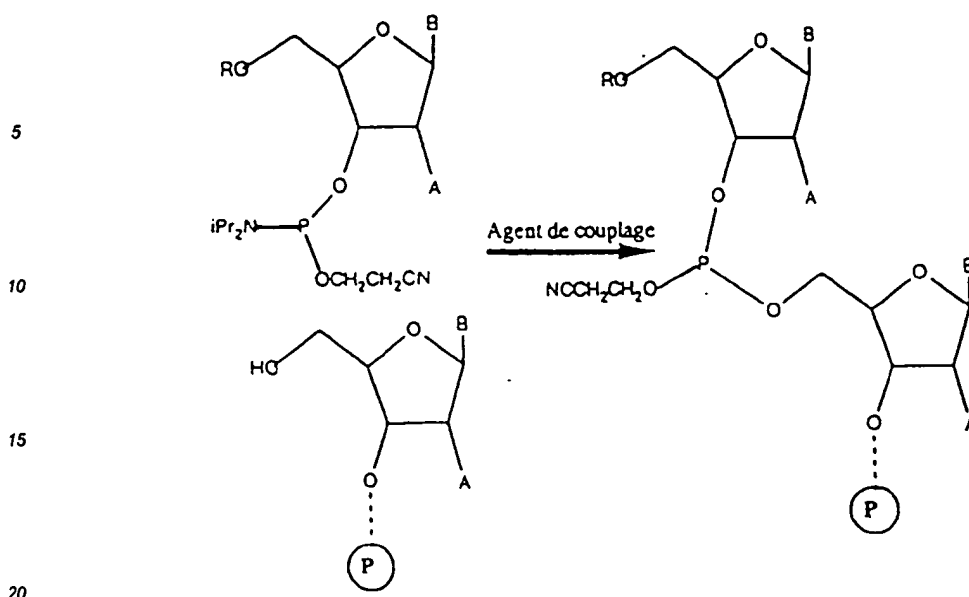
b) lorsque x = 0, R<sub>3</sub> est un atome d'oxygène porteur d'un groupe protecteur et R<sub>4</sub> est soit un halogène, soit un groupe amine disubstitué.

- Lorsque x est égal à 1, R<sub>3</sub> est un atome d'oxygène et R<sub>4</sub> est un atome d'oxygène, il s'agit alors de la méthode dite aux phosphodiester, lorsque R<sub>4</sub> est un atome d'oxygène porteur d'un groupement protecteur, il s'agit alors de la méthode dite aux phosphotriesters.

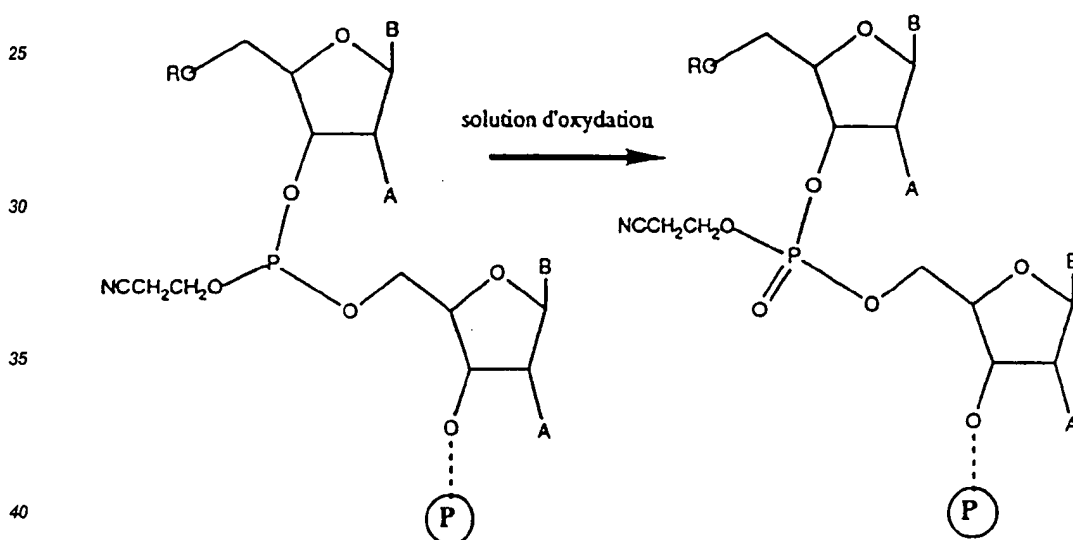
- Lorsque x est égal 1, R<sub>3</sub> est un atome d'hydrogène et R<sub>4</sub> est un atome d'hydrogène et R<sub>4</sub> est un atome d'oxygène chargé négativement, il s'agit alors de la méthode dite aux H-phosphonates, et

- Lorsque x est égal à 0, R<sub>3</sub> est un atome d'oxygène porteur d'un groupement protecteur et R<sub>4</sub> est soit un halogène, il s'agit alors de la méthode dite des phosphites et, lorsque R<sub>4</sub> est un groupe partant du type amine disubstitué, il s'agit alors de la méthode dite des phosphoramidites.

Les étapes d'un cycle de synthèse par la méthode aux phosphoramidites sont classiquement les suivantes:  
1) condensation de l'hydroxyle 5' terminal d'un nucléoside ou d'un oligonucléotide fixé de façon covalente au support solide avec un composé de type phosphite suivant la réaction:



2) oxydation de la liaison phosphite obtenue en phosphate suivant la réaction:



3) blocage des groupements hydroxyles des nucléosides n'ayant pas réagi;

4) libération de l'hydroxyle 5' terminal du dernier nucléoside afin de générer un site actif pour le cycle d

synthèse suivant.

Chaque nucléotide est ajouté séquentiellement sur le support par répétition des étapes 1 à 4. A la fin de la synthèse, l'oligonucléotide est séparé du support et libéré de ses groupements protecteurs par une réaction d'hydrolyse ménagée.

Les synthétiseurs commerciaux spécialisés dans la synthèse d'oligonucléotides sont conçus afin de réaliser automatiquement les étapes de synthèse ci-dessus décrites. Ces synthétiseurs sont composés généralement d'un réacteur contenant le support solide d'un mélangeur de réactifs, d'un ou plusieurs bloc(s) de sélection des réactifs et des récipients contenant lesdits réactifs. Les étapes de la synthèse sont effectuées par l'addition successive des réactifs sélectionnés dans le réacteur. Le plus souvent, le support solide est lavé par d l'acétonitrile après chaque étape.

Le support solide n'est pas immobilisé et il n'occupe pas le volume entier du réacteur mais, en général, la moitié seulement du volume du réacteur, et en tout cas pas plus des trois-quarts, de manière à permettre une bonne agitation de la phase solide.

Le réacteur, tel qu'il est utilisé sur les synthétiseurs commerciaux, a une forme de récipient traversé par

le flux des réactifs qui provoquent l'agitation (ou la fluidisation) du support solide. On considère en effet que l'agitation de la phase solide est essentielle car elle permet une meilleure pénétration des solvants et réactifs dans les pores de la phase solide constituée en général de billes poreuses ou de membranes poreuses (voir *Methods in Molecular Biology : Protocols for Oligonucleotides and Analogs - Synthesis and Properties - Edited by Sudhir Agrawal - 1993 - Humana Press, Totowa, New Jersey, pages 442-444 et 454*).

Le mélangeur est situé en amont du réacteur, relié à celui-ci par une canalisation. Les blocs de sélections des réactifs sont composés généralement d'électrovannes et permettent l'ouverture sélective des entrées/sorties du circuit hydraulique ainsi que des voies de cheminement des réactifs. La cohésion du système hydraulique est assurée par une série de tubes ou capillaires connectés de manière adéquate. Il est recommandé d'installer l'appareillage dans un local climatisé à 20°C, température à laquelle les réactions sont conduites.

Si l'efficacité des réactions est suffisante dans ces conditions, la durée des réactions et l'excès nécessaire de réactifs pour effectuer un bon lavage par dilutions successives, sont les principaux inconvénients des synthétiseurs tels que décrits ci-dessus. En l'occurrence, les consommations de réactifs et la durée des synthèses sont très supérieures aux valeurs calculées sur la base des lois connues de la synthèse organique. Ces inconvénients étaient attribués au facteur limitant que constitue la vitesse de diffusion des réactifs dans les pores.

On a découvert selon la présente invention que c'est principalement la géométrie du réacteur de type réciprocant, dans lequel les particules libres du support solide sont agitées selon le principe de réaction en phase "pseudo-liquide", qui comporte de nombreux inconvénients.

On a également découvert que plusieurs autres paramètres sont également en cause qui diminuent considérablement la productivité des synthétiseurs:

- les réactifs utilisés pour l'étape d'oxydation (solution iode, tétrahydrofurane, lutidine, eau) se dégradent au cours du temps, et la baisse de réactivité consécutive induit rapidement une diminution de l'efficacité de la synthèse ;
- l'absence de thermostatisation du réacteur et des réactifs conduit à la perte de reproductibilité des synthèses.

Le système hydraulique lui-même comporte souvent des volumes morts non-utilisables. Le temps passé par les réactifs dans ces volumes morts et dans la chambre de mélange, en particulier lors de l'activation du phosphoramidite par l'agent de couplage, limitent la réactivité des espèces transitoires formées.

C'est pourquoi la présente invention concerne un ensemble de modifications apportées au système ci-dessus décrit, ayant pour effet l'amélioration de la productivité par le biais de la diminution des consommations de réactifs et des durées de synthèse.

La caractéristique essentielle du procédé selon la présente invention se rapporte à l'immobilisation de la phase solide ou au mode de remplissage du réacteur par la phase solide.

La présente invention a en effet pour objet un procédé de préparation de polynucléotides sur support solide dans un réacteur en forme de colonne à travers laquelle on fait circuler les solutions de réactifs et/ou solvants, caractérisé en ce que la phase solide constituant ledit support solide est immobilisée dans ledit réacteur, et lesdites solutions migrent dans la colonne et à travers la phase solide selon une progression frontale, de sorte que les solutions successives de chaque étape d'un cycle de synthèse ne se mélangent pas.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation de polynucléotides sur support solide dans un réacteur en forme de colonne à travers laquelle on fait circuler les solutions de réactifs et/ou solvants, caractérisé en ce que le réacteur est une colonne entièrement remplie de particules d'un matériau poreux constituant ledit support solide.

Dans ce mode de réalisation où le support solide est constitué de particules libres d'un matériau poreux remplissant une colonne, les particules sont également immobilisées. L'immobilisation résulte en effet de ce qu'on entend ici par "colonne entièrement remplie" que le taux de remplissage en particules et la densité de répartition des particules dans la colonne sont tels que les particules sont suffisamment tassées de sorte qu'elles ne peuvent plus se mouvoir lorsque la colonne est traversée par un liquide.

Il peut s'agir d'une partie seulement de la colonne qui est entièrement remplie pourvu que les particules du support solide soit maintenue par des moyens appropriés dans ladite partie de la colonne.

Dans un mode de réalisation avantageux, la colonne aura une forme cylindrique.

On propose ainsi, pour la première fois, d'utiliser un réacteur de type "colonne de chromatographie", c'est-à-dire une colonne constituée d'un tube cylindrique entièrement rempli par la phase solide.

Ce type de colonnes, remplie de manière homogène avec le support solide, offre plusieurs avantages: les différentes solutions qui se succèdent dans le réacteur ne se mélangent pas, ou peu, il n'y a donc pas de phénomène de dilution des solutions par le réactif précédent et le lavage consécutif à chaque étape du cycle de synthèse s'en trouve très facilité. Selon le principe des colonnes de chromatographie, les solutions successives introduites à une extrémité de la colonne migrent selon une progression frontale, de sorte qu'une

solution "pouss " la précédente.

On a en effet observé que les phases solides utilisées classiquement en synthèse oligonucléotidique sur phase solide sont telles que l'affinité et les interactions physico-chimiques des différents réactifs et solvants utilisés sont négligeables et n'interfèrent pas sur leur diffusion à travers la phase solide autrement par les réactions chimiques souhaitées.

Il convient de mentionner que, bien entendu, dans la zone d'interface entre les solutions, il peut se produire localement un peu de mélange entre les solutions quand les débits de circulation des solutions sont importants. Toutefois ce mélange, localisé à l'interface, est sans commune mesure avec ce qui est observé dans les procédés antérieurs pour lesquels les lavages étaient basés sur le principe de dilution par mélange des solutions successives.

Contrairement au modèle classique, ces réacteurs permettent donc de diminuer notablement les volumes de réactifs nécessaires. Les débits utiles sont ajustés en fonction des constantes de diffusion et de la cinétique des réactions mises en jeu. La durée des cycles de synthèse s'en trouve considérablement diminuée. Pour chaque type de particules, en fonction de sa porosité, le débit des réactifs à travers la colonne ne doit pas dépasser une certaine valeur au-delà de laquelle les réactifs ne diffusent plus à l'intérieur des pores. Il s'agit d'un phénomène bien connu en chromatographie.

En outre, au sein du réacteur et quelle que soit sa taille, les conditions sont localement toujours identiques. Le système peut donc être appliqué à toutes les échelles de synthèse.

En particulier, on cite les matériaux constitués de polymères inorganiques, notamment de verre, de silice, d'oxydes métalliques, ou de polymères organiques, notamment de la cellulose, ou du polystyrène éventuellement substitué.

De préférence, le polymère est un polymère minéral constitué à base de verre ou de silice, notamment un gel de silice.

Lesdites particules peuvent être constituées de microbilles ou de microfibres agglomérées.

De préférence, dans le réacteur selon la présente invention, on utilise comme particules du support solide des microbilles poreuses, ce qui fournit la surface fonctionnalisée la plus importante en termes de poids de nucléosides liés au polymère par poids de polymères. La taille des billes peut aller de 5  $\mu\text{m}$  à 500  $\mu\text{m}$ , plus généralement de 40  $\mu\text{m}$  à 70  $\mu\text{m}$ . Les pores peuvent éventuellement traverser de part en part les microbilles. Le diamètre des pores peut varier entre 200 Å et 10.000 Å. On peut avoir recours à deux tailles de pores avec de larges pores (environ 10.000 Å) et des pores plus petits (300 Å). Ce type de pores à taille variable favorise la diffusion des solutions à travers la phase solide.

Le réacteur selon la présente invention permet d'exploiter au mieux les lois connues de la diffusion et de la cinétique des réactions chimiques bimoléculaires selon lesquelles les réactifs en solution diffusent très rapidement dans les pores du support solide et la cinétique de condensation du nucléoside libre sur l'extrémité 5'OH de l'oligonucléotide fixé au support est quasi-instantanée.

Le contrôle de la température du réacteur et des réactifs est une autre caractéristique essentielle de la présente invention qui n'existe, à ce jour, sur aucun synthétiseur du marché.

La température de travail est l'un des paramètres qui influencent directement et simultanément la cinétique des réactions chimiques mises en jeu, mais aussi la stabilité des réactifs et la viscosité des solutions.

A l'encontre de tous les préjugés qui prétendent que la synthèse des oligonucléotides diminue l'efficacité au-dessus de 30°C, on préconise selon la présente invention de thermostatier le réacteur à une température optimale de 45°C. La maîtrise de la température du système permet d'agir sur la cinétique des réactions chimiques mises en jeu ainsi que sur la viscosité des solutions utilisées.

De façon avantageuse, on mélange les réactifs, c'est-à-dire les agents de couplage tels que tétrazol, et les réactifs monomères, d'une part, et/ou les différents réactifs de la solution d'oxydation, d'autre part, immédiatement en amont du réacteur ou, éventuellement, juste en amont d'un système de distribution des réactifs dans un système multicolonne. De la sorte, on réduit les volumes morts non utilisables.

En particulier, on chauffe les réactifs avant de les introduire dans le réacteur et, le cas échéant, avant de les mélanger.

En effet, si on chauffe les réactifs seulement après leur mélange, on observe une inactivation mutuelle et une perte de réactivité sur la colonne. Plus précisément, le mélange précoce (trop loin du réacteur) des réactifs peut conduire à des réactions secondaires gênantes. En particulier, le mélange du tétrazole (acide faible) et des phosphoramidites peut entraîner la détrituration d'une partie des monomères. Les phosphoramidites peuvent ensuite réagir les uns avec les autres. Ce type de réactions conduit à la formation d'homopolymères qui peuvent ou non réagir avec l'oligonucléotide fixé au support. On peut constater, dans ce cas, la formation d'oligonucléotides plus longs que souhaité. Quoi qu'il en soit, le rendement de synthèse en est toujours diminué. Bien évidemment, ces phénomènes sont accentués par le chauffage. Il convient donc de chauffer les réactifs avant de les mélanger.

Dans les réacteurs utilisés avant la présente invention, au-dessus de 30°C les réactifs se dégradent rapidement. Mais, grâce au réacteur selon la présente invention, qui favorise la cinétique des réactions, il est possible d'augmenter la température jusqu'à 90°C (entre 20 et 90°C), de préférence on règle la température du réacteur entre 30 et 60°C, notamment à 45°C.

5 D'une manière avantageuse, l'étape de déprotection en milieu acide se fait avec du TFA (acide trifluoroacétique) dans du dichlorométhane. On utilise notamment une solution 1% v/v d'Acide Trifluoroacétique dans le dichlorométhane extra-sec, lors de l'étape de libération de la fonction 5' hydroxyle terminal (étape 4), en remplacement de la solution standard (2% d'Acide Dichloroacétique dans le dichlorométhane). Cette recommandation permet en particulier de s'affranchir des phénomènes d'ébullition éventuels de dichlorométhane, lors-  
10 que la température de travail excède 40°C.

Le mélange de l'acide acétique et de la pyridine provoque une augmentation des températures de 40 à 60°C, qui facilitent l'entretien de la température auxdites températures.

Grâce aux rendements de couplage très élevés (vraisemblablement supérieurs à 99%) du procédé selon l'invention, l'étape de blocage (ou "capping") des fonctions 5'-OH n'ayant pas réagi (étape 3) s'avère, dans  
15 la plupart des cas, peu efficace, voire complètement inutile et peut donc être omise. Ainsi, on ne remarque pas d'accumulation des fragments de synthèse de taille n-1 comme on pourrait s'y attendre si on n'effectue pas d'étape de capping. Vraisemblablement, lorsque l'efficacité des réactions est optimale, les espèces qui n'ont pas réagi sont définitivement inaccessibles.

Selon une autre caractéristique de la présente invention l'étape d'oxydation se fait avec de l'iode dans  
20 l'acide acétique et de la pyridine. Ainsi, en lieu et place de la solution d'oxydation classique, on utilise séparément deux réactifs, l'un constitué par exemple, par une solution d'iode saturée dans l'acide acétique glacial, l'autre étant de la pyridine ultra-pure. Ces réactifs sont avantageux en ce que, à l'étape d'oxydation (étape 2 ci-dessus), ces deux solutions peuvent être mélangées en quantités stochiométriques à l'entrée du réacteur. Le mélange ainsi formé est injecté dans le réacteur et assure instantanément et quantitativement l'oxydation  
25 de la liaison internucléotidique nouvellement formée. Ainsi, on tire avantage de la stabilité des deux solutions séparées en garantissant indéfiniment la reproductibilité de l'étape d'oxydation.

La présente invention a également pour objet un réacteur pour préparer des polynucléotides selon un procédé de l'invention, le réacteur ayant une forme de colonne contenant un support solide à travers lequel on fait circuler les solutions de réactifs et/ou solvants, caractérisé en ce que la phase solide constituant le support  
30 solide est immobilisée dans ledit réacteur de sorte que lesdites solutions migrent dans la colonne et à travers ladite phase solide selon une progression frontale, les solutions successives de chaque étape d'un cycle de synthèse ne se mélangeant pas ou peu.

En particulier, la présente invention a donc pour objet un réacteur utile dans un procédé de préparation de polynucléotides sur support solide, caractérisé en ce qu'il est constitué d'une colonne cylindrique entièrement  
35 remplie par les particules de matériaux poreux constituant le support solide tel que décrit ci-dessus.

La présente invention a enfin pour objet un dispositif pour la synthèse de polynucléotides sur support solide comportant un réacteur thermostaté, et un collecteur thermostaté qui réalise la collecte, le chauffage à la température du réacteur puis le mélange des réactifs avant leur introduction dans le réacteur.

D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description  
40 détaillée qui va suivre.

On a réalisé deux synthétiseurs d'oligonucléotides ou de polynucléotides conçus sur la base des améliorations techniques ci-dessus décrites. Les performances, la productivité de ces deux appareils s'en trouvent sensiblement augmentées par rapport aux appareils du marché.

Le premier synthétiseur a été conçu pour synthétiser des quantités d'oligonucléotides comprises entre 50  
45 umoles et 1 mmole. Ces performances peuvent donc être comparées à celles des synthétiseurs commerciaux, présents sur le marché, et capables de travailler à des échelles de synthèse équivalentes. Cet appareil est appelé "Synthétiseur LargeScale". Il est représenté sur la Figure 1.

La fonction du second appareil est de synthétiser, en parallèle, 24 oligonucléotides ou polynucléotides différents. L'échelle de chaque synthèse est comprise entre 0,05 et 1 umole. A ce jour, cet appareil n'a pas d'équivalent. Sa productivité peut être rapprochée de celle de 6 synthétiseurs-4-colonnes du marché. on le dénomme  
50 "Synthétiseur multicolonne". Il est représenté sur la Figure 2.

Ces deux appareils comprennent:

- les récipients [(1) à (10)] contenant les réactifs, comportant chacun un module de pompage volumétrique de type seringue [(11 à 20)];
- 55 - un collecteur thermostaté [(21)] dont les attributs sont la collecte, le chauffage et le contrôle de la température et le mélange des réactifs en mouvement.

Le "Synthétiseur LargeScale" est équipé d'un réacteur de type "colonne remplie" dont les dimensions sont ajustées en fonction de l'échelle de synthèse désirée [(22)].

Le "Synthétiseur Multicolonn " est équipé de 24 micro-colonnes [(22)] de même type que le "Synthétiseur LargeScale" mais dont les dimensions permettent de travailler aux échelles 0,05 umole, 0,1 umole, 0,2 umole et 1 umol . Entre le collecteur et les réacteurs se trouve un distributeur [(23)] chargé de répartir également les réactifs dans les 24 colonnes.

- 5 Enfin, un bloc composé de 24 électrovannes, asservies individuellement à chaque colonne, permet de sélectionner, à chaque étape de la synthèse, les réacteurs "en service".

Les volumes, les débits et les temps d'attente sont sous le contrôle d'un ordinateur. Le programme gère le bon enchaînement et l'exécution des cycles conformément aux séquences à synthétiser.

- 10 Afin de garantir des conditions locales toujours identiques quel que soit le nombre de réacteurs en service, le "Synthétiseur Multicolonne" fonctionne suivant un mode interactif. Ainsi, les volumes et les débits de chacun des réactifs sont ajustés, à chaque instant, au nombre de synthèses en cours.

#### A - Déroulement d'une synthèse au phosphoramidite sur le Synthétiseur LargeScale

- 15 L'échelle de synthèse est choisie au moment du lancement du programme.

Chaque synthèse débute par un cycle d'initialisation qui permet de laver et de thermostatier le réacteur à la température de travail.

Le programme comprend cinq cycles de synthèse correspondant à chacune des quatre bases et aux éventuelles bases modifiées.

- 20 Les cycles de synthèse se décomposent en étapes ou procédures de synthèse qui s'enchaînent dans l'ordre chronologique suivant:

- 1) Détritylation : libération de l'hydroxyle en position 5' du nucléoside ou de l'oligonucléotide fixé de façon covalente au support solide,
- 2) Premier lavage ;
- 25 3) Addition de la base : condensation du monomère de type phosphoramidite sur l'hydroxy 5' terminal libre du nucléoside ou de l'oligonucléotide fixé au support solide. Formation de la liaison internucléotidique ;
- 4) Second lavage ;
- 5) Oxydation de la liaison internucléotidique de type phosphite précédemment formée en phosphate ;
- 6) Troisième lavage.

- 30 Ces cycles sont répétés autant de fois que le nécessite la synthèse d'oligonucléotide ou d'un polynucléotide de longueur souhaitée.

#### B - Déroulement d'une synthèse sur le Synthétiseur Multicolonne

- 35 L'échelle de synthèse est choisie au moment du lancement du programme.

Chaque synthèse débute par un cycle d'initialisation qui permet de laver et de thermostatier les réacteurs à la température de travail.

Il n'existe qu'un seul cycle de synthèse qui est répété autant de fois que le nécessite la fabrication des 24 oligo- ou polynucléotides.

- 40 Ce cycle peut être décomposé de la façon suivante :

- a) Sélection des colonnes à détrityler.

- 1) Détritylation : libération de l'hydroxyle en position 5' du nucléoside ou de l'oligonucléotide fixé de façon covalente au support solide.
- 2) Premier lavage :

- 45 b1) Sélection des colonnes devant recevoir la base A.

- 3-1) Addition de la base A: condensation du monomère A de type phosphoramidite sur l'hydroxy 5' terminal libre du nucléoside ou de l'oligonucléotide fixé au support solide. Formation de la liaison internucléotidique.

- b2) Sélection des colonnes devant recevoir la base G.

- 50 3-2) Addition de la base G: condensation du monomère G de type phosphoramidite sur l'hydroxy 5' terminal libre du nucléoside ou de l'oligonucléotide fixé au support solide. Formation de la liaison internucléotidique.

- b3) Sélection des colonnes devant recevoir la base T.

- 55 3-3) Addition de la base T : condensation du monomère T de type phosphoramidite sur l'hydroxy 5' terminal libre du nucléoside ou de l'oligonucléotide fixé au support solide. Formation de la liaison internucléotidique.

- b4) Sélection des colonnes devant recevoir la base C.

- 3-4) Addition de la base C: condensation du monomère C de type phosphoramidite sur l'hydroxy



5' terminal libre du nucléoside ou de l'oligonucléotide fixé au support solide. Formation de la liaison inter-nucléotidique.

c) Sélection des colonnes à oxyder.

4) Second lavage.

5) Oxydation de la liaison internucléotidique de type phosphite précédemment formée en phosphate.

6) Troisième lavage.

#### Description des étapes ci-dessus citées

10 Chaque étape peut être décrite en se référant aux schémas fournis des synthétiseurs (Figures 1 et 2).

1) Détritylation : le réactif n° 10, préférentiellement une solution d'Acide Trifluoroacétique à 1% v/v dans du dichloroéthane extra-sec, est poussé au travers du réacteur au moyen du module de seringue n° 10. Le volume nécessaire est compris entre 2 et 10 fois le volume du réacteur vide.

Le débit dans la colonne est inférieur à 500 cm/min.

15 Cette unité de débit en cm/min représente en fait la vitesse linéaire des solutions à l'intérieur de la colonne et est donc indépendante du diamètre de la colonne.

Les débits en volume doivent être ajustés en fonction du diamètre du réacteur. Pour changer la taille du réacteur en conservant localement les conditions de synthèse, il suffit de modifier le débit en volume en faisant en sorte que la vitesse linéaire à l'intérieur du réacteur, donnée en cm/min, ne change pas.

20 Les débits que l'on utilise sont compatibles avec les constantes de diffusion dans les pores, c'est-à-dire que la vitesse linéaire des solutions à l'intérieur de la colonne n'est pas supérieure à la vitesse de diffusion à travers les pores. Dans le cas contraire, on aurait une faible efficacité des réactifs et des lavages conduisant à la diminution des rendements de synthèse.

Le temps total de réaction est compris entre 10 et 120 secondes.

25 2) Premier lavage : le réactif n° 1, préférentiellement de l'acétonitrile extra-sec, est poussé au travers du réacteur au moyen du module de seringue n° 1.

Le volume nécessaire est compris entre 2 et 10 fois le volume du réacteur vide.

Le débit dans la colonne est inférieur à 500 cm/min.

30 3) Couplage : les réactifs n° 3, ou n° 4, ou n° 5, ou n° 6, ou n° 7, et n° 2, respectivement une solution 0,1 M de chaque monomère et une solution 0,45% de tétrazole dans l'acétonitrile, sont poussés conjointement au travers du réacteur au moyen des modules de seringue n° 3, ou n° 4, ou n° 5, ou n° 6, ou n° 7, et n° 2 respectivement.

Les rapports des volumes et des débits des réactifs n° 3, ou n° 4, ou n° 5, ou n° 6, ou n° 7, et n° 2 peuvent être différents de 1.

35 Le volume total nécessaire est compris entre 2 et 10 fois le volume du réacteur vide.

Le débit global dans la colonne est inférieur à 500 cm/min.

Le temps de réaction est inférieur à 1 minute.

4) Second lavage : le réactif n° 1, préférentiellement de l'acétonitrile extra-sec, est poussé au travers du réacteur au moyen du module de seringue n° 1.

40 Le volume nécessaire est compris entre 0,5 et 5 fois le volume du réacteur vide.

Le débit dans la colonne est inférieur à 500 cm/min.

5) Oxydation : les réactifs n° 8 et n° 9, respectivement une solution saturée d'iode dans l'acide acétique glacial et de la pyridine ultra-pure, sont poussés conjointement au travers du réacteur au moyen des modules de seringue n° 8 et n° 9 respectivement.

45 Les rapports des volumes et des débits des réactifs n° 8 et n° 9 sont égaux à 1.

Le volume total nécessaire est compris entre 1 et 5 fois le volume du réacteur vide.

Le débit global dans la colonne est inférieur à 500 cm/min.

Le temps de réaction est inférieur à 30 secondes.

50 6) Troisième lavage : le réactif n° 1, préférentiellement de l'acétonitrile extra-sec, est poussé au travers du réacteur au moyen du module de seringue n° 1.

Le volume nécessaire est compris entre 1 et 5 fois le volume du réacteur vide.

Le débit dans la colonne est inférieur à 500 cm/min.

Les exemples de tailles de réalisation qui suivent servent à illustrer le procédé selon l'invention.

55 **Exemple 1 : Synthèse d'un oligonucléotide, à l'échelle 30 µm, à l'aide du Synthétiseur LargeScale**

1

L'appareil utilisé est celui décrit précédemment.

Le réacteur utilisé est une colonne cylindrique en verre, de diamètre 10 mm et de hauteur 25 mm.

La température de travail est de 45°C.

Les cycles de synthèse sont détaillés dans le Tableau 1.

On a synthétisé, dans ces conditions, un oligodéoxynucléotide, long de 18 bases, dont la séquence est :

5

d(ACG TTC CTC CTG CGG GAA).

Le réacteur est rempli soigneusement avec 0,66 g de CPG 500Å (CPG INC., USA), "dérivatisé" par le premier nucléoside A. La capacité du support est de 45 umoles/g (densité de 3 ml/g).

10 L'échelle de synthèse est de 30 umoles.

Après une étape de lavage par l'acétonitrile, on exécute 17 fois le cycle de synthèse tel qu'il est décrit dans le Tableau 1.

Dans ces conditions, l'oligonucléotide, de longueur souhaitée, conserve le groupement transitoire diméthoxytrityl en position 5' terminale.

15 L'oligonucléotide est séparé de la CPG et libéré des groupements protecteurs permanents par un traitement approprié du support, "dérivatisé" suivant la méthode ci-dessus décrite, par 10 ml d'une solution aqueuse d'ammoniaque à 30%, pendant 16 heures à 55°C.

Après avoir ajouté 40 ml d'éthanol absolu et 1 ml d'une solution aqueuse d'acétate de sodium 3M, l'oligonucléotide est mis à précipiter pendant deux heures à 0°C.

20 Le précipitat est ensuite filtré sur une membrane lopridyne 1,2 µ (PALL S.A., FRANCE) et resolubilisé dans 10 ml d'eau.

Après lecture de la densité optique à 260 nm, on obtient 4000 U.D.O., soit 120 mg de mélange brut de synthèse.

25 La pureté de l'oligonucléotide de longueur souhaitée, estimée par HPLC sur colonne de phase inverse, est de 88%.

#### **Exemple 2 : Synthèse d'un oligonucléotide, à l'échelle 77 umoles, à l'aide du Synthétiseur LargeScale**

30 L'appareil utilisé est le même que pour l'exemple précédent.

Le réacteur utilisé est une colonne cylindrique en verre, de diamètre 10 mm et de hauteur 25 mm.

La température de travail est de 45°C.

Les cycles de synthèse sont détaillés dans le Tableau 2.

On a synthétisé, dans ces conditions, un oligodéoxynucléotide, long de 18 bases, dont la séquence est :

35

d(TTC CGC CAG GAG GAA CGT).

Le réacteur est rempli soigneusement avec 0,66 g de CPG 500Å High-Loaded, "dérivatisé" par le premier nucléoside T. La capacité du support est de 110 umoles/g, sa densité de 3 ml/g (MILLIPORE S.A., FRANCE).

40 L'échelle de synthèse est de 77 umoles.

Après une étape de lavage par l'acétonitrile, nous avons exécuté 17 fois le cycle de synthèse tel qu'il est décrit dans le Tableau 2.

Dans ces conditions, l'oligonucléotide, de longueur souhaitée, conserve le groupement transitoire diméthoxytrityl en position 5' terminale.

45 Les conditions de déprotection et de récupération de l'oligonucléotide sont les mêmes que celles décrites à l'exemple précédent.

Après lecture de la densité optique à 260 nm, on obtient 8500 U.D.O., soit 255 mg de mélange brut de synthèse.

50 La pureté de l'oligonucléotide de longueur souhaitée, estimée par HPLC sur colonne de phase inverse, est de 84%.

#### **Exemple 3 : Synthèse d'un oligonucléotide, à l'échelle 100 umoles, à l'aide du Synthétiseur large Scale**

55 L'appareil utilisé est le même que pour l'exemple précédent.

Le réacteur utilisé est une colonne cylindrique en verre, de diamètre 15 mm et de hauteur 34 mm.

La température de travail est de 45°C.

Les cycles de synthèse sont détaillés dans le Tableau 3.

On synthétise, dans ces conditions, un oligodéoxynucléotide, long de 56 bases, dont la séquence est:

d(TAA CCA CAC TTT TTG TGT GGT TAA TGA TCT ACA GTT ATT TTT TAA CTG TAG  
ATC AT).

5

Le réacteur est rempli soigneusement avec 2 g de CPG 500A, "dérivatisé" par le premier nucléoside T. La capacité du support est de 50  $\mu$  moles/g, sa densité de 3 ml/g (MILLIPORE S.A., FRANCE).

L'échelle de synthèse est de 100  $\mu$  moles.

10 Après une étape de lavage par l'acétonitrile, nous avons exécuté 55 fois le cycle de synthèse tel qu'il est décrit dans le Tableau 3.

Dans ces conditions, l'oligonucléotide, de longueur souhaitée, conserve le groupement transitoire diméthoxytrityl en position 5' terminale.

15 Les conditions de déprotection et de récupération de l'oligonucléotide sont les mêmes que celles décrites aux exemples précédents.

Après lecture de la densité optique à 260 nm, on obtient 31 000 U.D.O., soit 930 mg de mélange brut de synthèse.

La pureté de l'oligonucléotide de longueur 56-mères, estimée par HPLC sur colonne de phase inverse, est de 61%.

20

#### **Exemple 4 : Synthèses simultanées de 24 oligonucléotides différents à l'aide du Synthétiseur Multi-colonnes**

Les réacteurs sont des micro-colonnes métalliques de diamètre 1,5 mm et de hauteur 6 mm.

25 La température de travail est de 50°C.

Les cycles de synthèse sont détaillés dans le Tableau 4.

Nous avons synthétisé, dans ces conditions, les oligodéoxynucléotides dont les séquences sont données dans le Tableau 5.

30 Les réacteurs sont remplis régulièrement avec 2 mg de CPG 500 A universelle comportant un groupe époxyde (préparé selon l'exemple 1 de la demande de brevet FR 93 08498). La capacité du support est de 50  $\mu$  moles/g (GENSET S.A., FRANCE) (densité: 3 ml/g).

L'échelle de synthèse est de 0,1  $\mu$  moles.

Après une étape de lavage par l'acétonitrile, nous avons exécuté les opérations décrites dans le Tableau 4, autant de fois que le nécessite la synthèse des 24 oligodéoxynucléotides du Tableau 5.

35 Les conditions de déprotection et de récupération de l'oligonucléotide sont les mêmes que celles décrites aux exemples précédents.

Après lecture de la densité optique à 260 nm, on obtient, en moyenne, 11 U.D.O. de chacun des oligonucléotides, soit 0,33 mg. La pureté des oligonucléotides, estimée par HPLC, sur colonne de phase inverse pour les oligodéoxynucléotides 5' OTrityl, et sur colonne échangeuse d'anions pour les oligonucléotides 5'OH, excède 84%.

40

#### **Exemple comparatif 5**

45 Le Tableau 6 ci-après présente les caractéristiques des synthèses effectuées avec des réacteurs à fluidisation commercialisées par APPLIED BIOSYSTEMS et MILLIPORE telles que décrites dans la littérature.

Les synthétiseurs utilisés sont les suivants:

- SYNTHETISEUR APPLIED, modèle 394 :

. réacteur en forme de colonne:

diamètre 5 mm

50 hauteur 6 mm

volume 0,11 ml

. support solide:

CPG 500 Å (CPG INC., USA)

capacité: 30  $\mu$  moles/g

55 densité: 3 ml/g

Pour une synthèse à l'échelle 0,2  $\mu$  mole:

6,7 mg de CPG, soit un volume de

0,02ml et un taux de remplissage de 20%.

- SYNTHETISEUR MILLIPORE modèle 8800:
  - . Réacteur en forme de récipient de 225 ml, utilisabl avec 1 à 15 g de CPG.

- Pour nos exemples:

- . méthode "STANDARD" pour 100 umoles

5

- . support solide:

- CPG 500Å (MILLIPORE S.A., FRANCE)

- capacité: 30 umoles/g

- densité: 3 ml/g

- Pour 100 umoles:

10

- 3,33 g de CPG

- soit 10 ml de phase et un taux de remplissage de 4,5%.

- . méthode "AMELIOREE" pour 100 umoles

- . support solide:

- CPG 500Å HIGH-LOADED (MILLIPORE S.A., FRANCE)

15

- capacité: 100 umoles/g

- densité: 3 ml/g

- Pour 100 umoles:

- 1 g de CPG

- soit 3 ml de phase et un taux de remplissage de 1,3%.

20

En comparaison aux résultats décrits aux Exemples 1 à 4, la diminution de la durée de synthèse et des quantités de réactifs est considérable.

Pour la synthèse de 100  $\mu$ moles :

- avec le procédé selon l'invention (Exemple 3 et Tableau 3), on utilise 118 ml de réactifs et solvants, et la durée de synthèse est de 3 minutes par cycle de synthèse ;
- avec une colonne MILLIPORE, on utilise 500 ml de réactifs et solvants, et la durée de synthèse est de 20 minutes par cycle.

25

30

35

40

45

50

55

TABLEAU 1

SOLVANTS OU RÉACTIFS	RECIPIENT N°	VOLUME	DÉBIT IND.	DEBIT TOTAL	TEMPS
Dichloroéthane, TFA 1% v/v	10	20 ml	72 ml/min		17 sec
Temps d'attente					20 sec
Acétonitrile	1	8 ml	72 ml/min		7 sec
Tétrazole 0,45M dans l'Acétonitrile	2	3 ml	60 ml/min		3 sec
Tétrazole 0,45M dans l'Acétonitrile plus monomère 0,1M dans l'acétonitrile	2	6 ml	36 ml/min	48 ml/min	10 sec
Temps d'attente		2 ml	12 ml/min		20 sec
Tétrazole 0,45M dans l'Acétonitrile	2	1 ml	60 ml/min		1 sec
Acétonitrile	1	2 ml	60 ml/min		2 sec
Iode sat. dans l'Acide Acétique plus Pyridine	8	2,5 ml	30 ml/min	60 ml/min	5 sec
	9	2,5 ml	30 ml/min		
Acétonitrile	1	10 ml	60ml/min		10 sec
TOTAL		57 ml			1 min 35 sec

TABLEAU 2

SOLVANTS OU RÉACTIFS	RECIPIENT N°	VOLUME	DÉBIT IND.	DEBIT TOTAL	TEMPS
Dichloroéthane, TFA 1% v/v	10	20 ml	72 ml/min		17 sec
Temps d'attente					30 sec
Acétonitrile	1	8 ml	72 ml/min		7 sec
Tétrazole 0,45M dans l'Acétonitrile	2	3 ml	60 ml/min		3 sec
Tétrazole 0,45M dans l'Acétonitrile plus	2	6 ml	36 ml/min		
monomère 0,1M dans l'acétonitrile	3,4,5,6 ou 7	2,1 ml	12,6 ml/min	48,6 ml/min	10 sec
Temps d'attente					40 sec
Tétrazole 0,45M dans l'Acétonitrile	2	1 ml	60 ml/min		1 sec
Acétonitrile	1	2 ml	60 ml/min		2 sec
Iode sat. dans l'Acide Acétique plus	8	2,5 ml	30 ml/min		
Pyridine	9	2,5 ml	30 ml/min	60 ml/min	5 sec
Acétonitrile	1	10 ml	60ml/min		10 sec
TOTAL		57,1 ml			2 mln 05 sec

TABLEAU 3

SOLVANTS OU RÉACTIFS	RECIPIENT N°	VOLUME	DÉBIT IND.	DEBIT TOTAL	TEMPS
Dichloroéthane, TFA 1% v/v	10	40 ml	84 ml/min		30 sec
Temps d'attente					30 sec
Acétonitrile	1	14 ml	72 ml/min		15 sec
Tétrazole 0,45M dans l'Acétonitrile	2	6 ml	60 ml/min		6 sec
Tétrazole 0,45M dans l'Acétonitrile plus monomère 0,1M dans l'acétonitrile	2	14 ml	36 ml/min	48 ml/min	25 sec
Temps d'attente		5ml	12 ml/min		45 sec
Tétrazole 0,45M dans l'Acétonitrile	2	3 ml	60 ml/min		3 sec
Acétonitrile	1	6 ml	60 ml/min		6 sec
Iode sat. dans l'Acide Acétique plus Pyridine	8	5 ml	30 ml/min	60 ml/min	10 sec
	9	5 ml	30 ml/min		
Acétonitrile	1	20 ml	60ml/min		15 sec
TOTAL		118 ml			3 mn 05 sec

TABLEAU 4

ETAP		Détermination	Actéonitrile	Tétrazole 0,45M	Tétrazole 0,45M	Tétrazole 0,45M	Actéonitrile	Sol Orde Sol	Actéonitrile	VOLUME TOTAL (ml)	TEMPERATURE (°C)
RECÉPTEUR	VOLUME (ml)	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 COLONNE	DEBIT (ml/min)	0,8	0,4	0,0378	0,08	0,025	0,4	0,1	0,4	2,3478	0,18
2 COLONNES	VOLUME (ml)	8	4,8	2,25	2,04	1,5	4,8	3	4,8	3,438	0,18
3 COLONNES	DEBIT (ml/min)	1,2	0,6	0,076	0,16	0,08	0,8	0,18	0,6	3,438	0,52
4 COLONNES	VOLUME (ml)	9	7,2	4,5	2,04	3	7,2	3,15	7,2	4,8278	0,52
5 COLONNES	DEBIT (ml/min)	1,6	0,8	0,1128	0,24	0,078	0,8	0,2	0,8	4,8278	0,52
6 COLONNES	VOLUME (ml)	12	6,6	6,75	5,88	4,5	6,6	3,3	6,6	5,62	0,52
7 COLONNES	DEBIT (ml/min)	2	1	0,16	0,32	0,1	1	0,25	1	5,62	0,52
8 COLONNES	VOLUME (ml)	15	12	9	8,82	6	12	3,45	12	7,0128	0,52
9 COLONNES	DEBIT (ml/min)	2,4	1,2	0,1878	0,4	0,128	1,2	0,3	1,2	7,0128	0,52
10 COLONNES	VOLUME (ml)	18	14,4	11,25	11,76	7,5	14,4	3,6	14,4	8,208	0,54
11 COLONNES	DEBIT (ml/min)	2,8	1,4	0,238	0,48	0,18	1,4	0,38	1,4	8,208	0,54
12 COLONNES	VOLUME (ml)	21	16,8	13,5	14,7	9	16,8	3,75	16,8	9,3878	0,54
13 COLONNES	DEBIT (ml/min)	3,2	1,6	0,2828	0,68	0,178	1,6	0,4	1,6	9,3878	0,55
14 COLONNES	VOLUME (ml)	24	19,2	15,75	17,64	10,5	19,2	3,9	19,2	10,59	0,55
15 COLONNES	DEBIT (ml/min)	3,6	1,8	0,3	0,84	0,2	1,8	0,45	1,8	10,59	0,55
16 COLONNES	VOLUME (ml)	27	21,6	16	20,56	12	21,6	4,05	21,6	11,7828	0,56
17 COLONNES	DEBIT (ml/min)	4	2	0,3378	0,72	0,228	2	0,6	2	11,7828	0,57
18 COLONNES	VOLUME (ml)	30	24	20,25	23,52	13,5	24	4,2	24	12,978	0,57
19 COLONNES	DEBIT (ml/min)	4,4	2,2	0,378	0,8	0,26	2,2	0,68	2,2	12,978	0,57
20 COLONNES	VOLUME (ml)	33	26,4	22,5	26,46	15	26,4	4,35	26,4	14,1678	0,58
21 COLONNES	DEBIT (ml/min)	4,8	2,4	0,4128	0,88	0,278	2,4	0,8	2,4	14,1678	0,58
22 COLONNES	VOLUME (ml)	36	28,8	24,75	29,4	16,5	28,8	4,5	28,8	15,36	0,59
23 COLONNES	DEBIT (ml/min)	5,2	2,6	0,46	0,96	0,3	2,6	0,65	2,6	15,36	0,59
24 COLONNES	VOLUME (ml)	39	31,2	27	32,34	18	31,2	4,65	31,2	16,5528	0,59
25 COLONNES	DEBIT (ml/min)	5,6	2,8	0,4878	1,04	0,328	2,8	0,7	2,8	16,5528	0,59
26 COLONNES	VOLUME (ml)	42	33,6	28,25	35,26	19,5	33,6	4,8	33,6	17,748	0,60
27 COLONNES	DEBIT (ml/min)	6	3	0,525	1,12	0,36	3	0,78	3	17,748	0,60
28 COLONNES	VOLUME (ml)	45	36	31,5	38,22	21	36	4,95	36	18,9378	0,60
29 COLONNES	DEBIT (ml/min)	6,4	3,2	0,5688	1,2	0,378	3,2	0,8	3,2	18,9378	0,60
30 COLONNES	VOLUME (ml)	48	38,4	33,75	41,16	22,5	38,4	5,1	38,4	20,13	0,61
31 COLONNES	DEBIT (ml/min)	6,8	3,4	0,6	1,28	0,4	3,4	0,88	3,4	20,13	0,61
32 COLONNES	VOLUME (ml)	51	40,8	36	44,1	24	40,8	5,25	40,8	21,3228	0,61
33 COLONNES	DEBIT (ml/min)	7,2	3,6	0,6378	1,36	0,428	3,6	0,9	3,6	21,3228	0,61
34 COLONNES	VOLUME (ml)	54	43,2	38,25	47,04	25,5	43,2	5,4	43,2	22,518	0,62
35 COLONNES	DEBIT (ml/min)	7,6	3,8	0,676	1,44	0,48	3,8	0,98	3,8	22,518	0,62
36 COLONNES	VOLUME (ml)	57	45,6	40,5	48,06	27	45,6	5,55	45,6	23,7078	0,62
37 COLONNES	DEBIT (ml/min)	8	4	0,7128	1,52	0,478	4	1	4	23,7078	0,62
38 COLONNES	VOLUME (ml)	60	48	42,75	52,02	28,5	48	5,7	48	24,9	0,62
39 COLONNES	DEBIT (ml/min)	8,4	4,2	0,748	1,6	0,5	4,2	1,05	4,2	24,9	0,62
40 COLONNES	VOLUME (ml)	63	50,4	45	55,06	30	50,4	5,85	50,4	26,0928	0,62
41 COLONNES	DEBIT (ml/min)	8,8	4,4	0,7878	1,68	0,528	4,4	1,1	4,4	26,0928	0,63
42 COLONNES	VOLUME (ml)	66	52,8	47,25	58,0	31,5	52,8	6	52,8	27,288	0,63
43 COLONNES	DEBIT (ml/min)	9,2	4,6	0,825	1,76	0,55	4,6	1,16	4,6	27,288	0,63
44 COLONNES	VOLUME (ml)	69	55,2	48,5	61,74	33	55,2	6,15	55,2	28,4778	0,64
45 COLONNES	DEBIT (ml/min)	9,6	4,8	0,8628	1,84	0,578	4,8	1,2	4,8	28,4778	0,64
46 COLONNES	VOLUME (ml)	72	57,6	51,75	64,68	34,5	57,6	6,3	57,6	29,67	0,64
47 COLONNES	DEBIT (ml/min)	10	5	0,9	1,92	0,6	5	1,28	5	29,67	0,64
48 COLONNES	VOLUME (ml)	75	60	54	67,62	36	60	6,45	60	30,87	0,64



TABLEAU 5

COLONNE N°	OLIGO	5' Triityl	Nbre bases	SEQUENCE 5'-3'
0	OLIGO1	OUI	12	TTT TTT TTT TTT
1	OLIGO2	NON	12	TTT TTT TTT TTT
2	OLIGO3	OUI	15	TTT TTT TTT TTT TTT
3	OLIGO4	NON	15	TTT TTT TTT TTT TTT
4	OLIGO5	OUI	18	TTT TTT TTT TTT TTT TTT
5	OLIGO6	NON	18	TTT TTT TTT TTT TTT TTT
6	OLIGO7	OUI	12	AAA AAA AAA AAA
7	OLIGO8	NON	12	AAA AAA AAA AAA
8	OLIGO9	OUI	15	AAA AAA AAA AAA AAA
9	OLIGO10	NON	15	AAA AAA AAA AAA AAA
10	OLIGO11	OUI	18	AAA AAA AAA AAA AAA AAA
11	OLIGO12	NON	18	AAA AAA AAA AAA AAA AAA
12	OLIGO13	OUI	12	CCC CCC CCC CCC
13	OLIGO14	NON	12	CCC CCC CCC CCC
14	OLIGO15	OUI	15	CCC CCC CCC CCC CCC
15	OLIGO16	NON	15	CCC CCC CCC CCC CCC
16	OLIGO17	OUI	18	CCC CCC CCC CCC CCC CCC
17	OLIGO18	NON	18	CCC CCC CCC CCC CCC CCC
18	OLIGO19	OUI	12	AGT CAG TCA GTC
19	OLIGO20	NON	12	AGT CAG TCA GTC
20	OLIGO21	OUI	15	AGT CAG TCA GTC AGT
21	OLIGO22	NON	15	AGT CAG TCA GTC AGT
22	OLIGO23	OUI	18	AGT CAG TCA GTC AGT CAG
23	OLIGO24	NON	18	AGT CAG TCA GTC AGT CAG

TABLEAU 6

SYNTHETISEURS CARACTERISTIQUES ECHELLE DE SYNTHESE METHODE	ABI 394 4 COLONNES 0,2 umoles STANDARD*	MILLIPORE LARGE-SCALE 100 umoles STANDARD**	MILLIPORE LARGE-SCALE 100 umoles AMELIORE**
REACTIFS	(ml)	(ml)	(ml)
MONOMERES 0,1M	0,110	5	2,62
SOLUTION DE TETRAZOLE	0,400	20,3	19
CAP A (anhydride acétique)	0,290	9	6,25
CAP B (N-Méthylimidazole)	0,260	11,6	8,65
DEBLOCK (TCA/DCM)	1,100	84,3	68,75
SOLUTION D'IODE	0,350	40	33
ACETONITRILE	8,000	376	286,25
TOTAL	10,510	546,2	424,52
TEMPS PAR CYCLE	6 min.	20 min.	22 min.

\* APPLIED BIOSYSTEMS

Manuel d'utilisation du synthétiseur ABI 394

\*\* N.D.SINHA, S.FRY; 3rd CAMBRIDGE SYMPOSIUM

Oligonucléotides & Analogues, 5-8 septembre 1993

POSTER COMMUNICATION

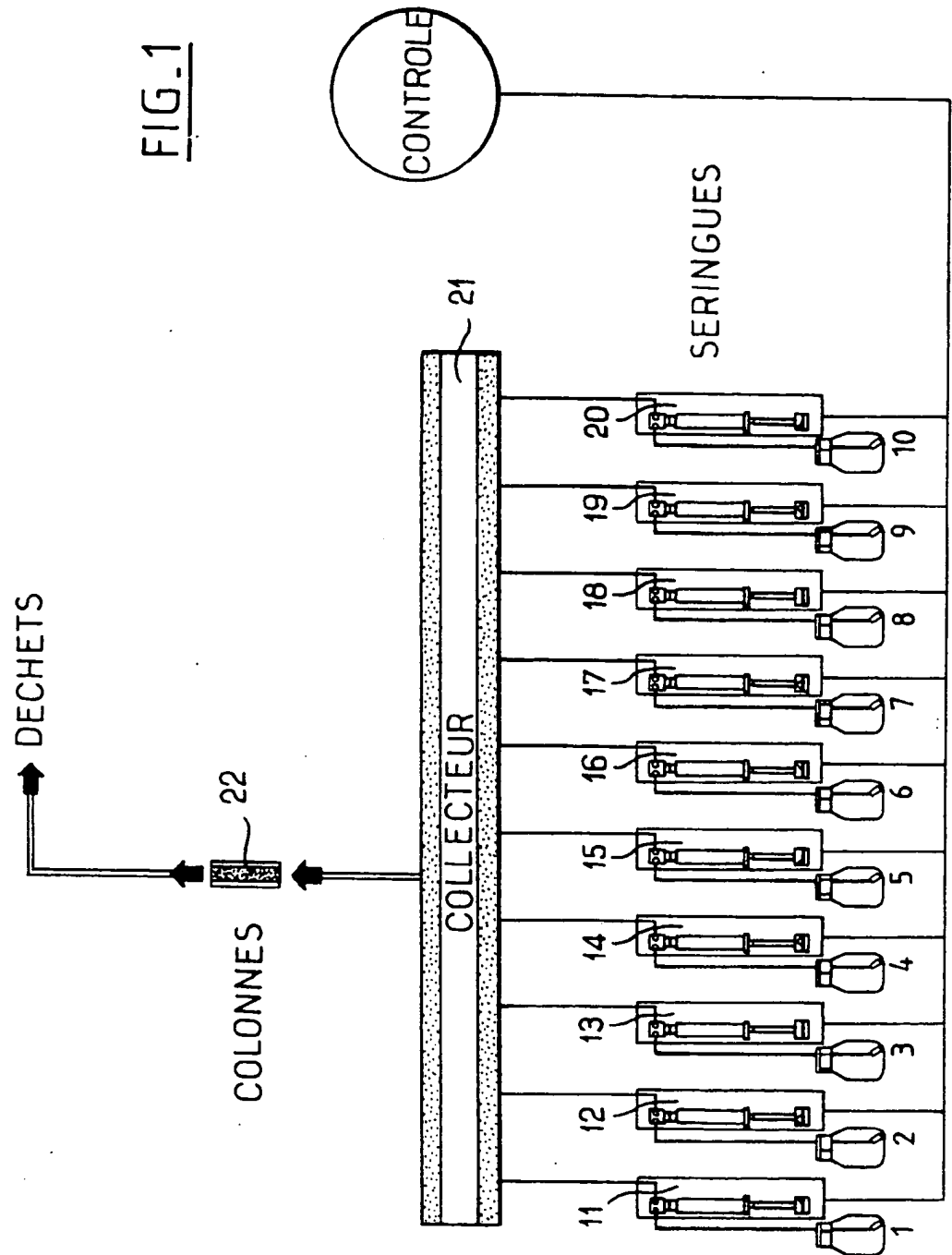
### Revendications

1. Procédé de préparation de polynucléotides sur support solide dans un réacteur en forme de colonne à travers laquelle on fait circuler les solutions de réactifs et/ou solvants, caractérisé en ce que la phase solide constituant ledit support solide est immobilisée dans ledit réacteur, et lesdites solutions migrent dans la colonne et à travers la phase solide selon une progression frontale, de sorte que les solutions successives de chaque étape d'un cycle de synthèse ne se mélangent pas.
2. Procédé de préparation de polynucléotides sur support solide dans un réacteur en forme de colonne à travers laquelle on fait circuler les solutions de réactifs et/ou solvants, caractérisé en ce que le réacteur est une colonne entièrement remplie de particules d'un matériaux poreux constituant ledit support solide.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que le réacteur a la forme d'une colonne cylindrique.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la phase solide est constituée de particules consistant dans des microbilles poreuses.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que le réacteur est maintenu à une température comprise entre 30°C et 60°C, de préférence de l'ordre de 45°C.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce qu'on chauffe les réactifs à la température du réacteur avant de les introduire dans ledit réacteur et, le cas échéant, avant de les mélanger.
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisé en ce que l'étape de déprotection se fait avec du TFA dans du dichloroéthane.
8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce que l'étape d'oxydation se fait avec de l'iode dans l'acide acétique et de la pyridine.
9. Réacteur pour préparer des polynucléotides selon un procédé des revendications 1 à 8, le réacteur ayant une forme de colonne contenant un support solide à travers lequel on fait circuler les solutions de réactifs et/ou solvants, caractérisé en ce que la phase solide constituant le support solide est immobilisée dans ledit réacteur de sorte que lesdites solutions migrent dans la colonne et à travers ladite phase solide selon une progression frontale, les solutions successives de chaque étape d'un cycle de synthèse ne se mélangeant pas ou peu.
10. Réacteur utile dans un procédé de préparation de polynucléotides sur support solide selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il est constitué d'une colonne cylindrique entièrement remplie par les particules de matériaux poreux constituant le support solide.
11. Réacteur selon la revendication 10 caractérisé en ce que les particules sont des microbilles poreuses.
12. Réacteur selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que le réacteur peut être thermostaté à une température entre 30°C et 60°C, de préférence 45°C.
13. Dispositif pour la synthèse de polynucléotides sur support solide comportant le réacteur thermostaté selon l'une des revendications 9 à 12, et un collecteur thermostaté qui réalise la collecte, le chauffage à la température du réacteur, puis le mélange des réactifs avant leur introduction dans le réacteur.

# SCHEMA DU SYNTHETISEUR LARGESCALE

FIG.1



# SYNTHETISEUR PARALLELE : ARCHITECTURE GENERALE

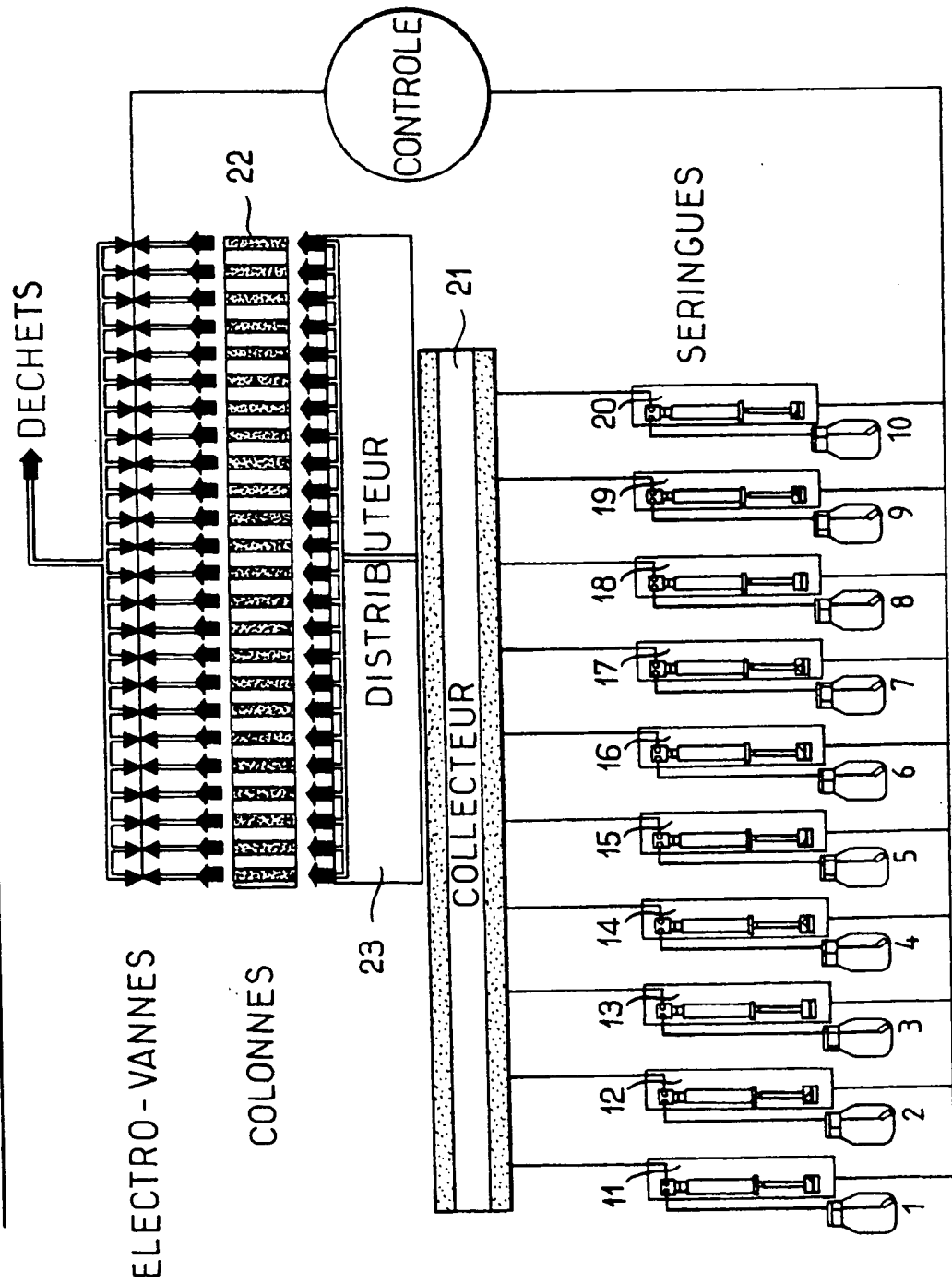


FIG. 2



Office européen  
des brevets

**RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE** . Numéro de la demande  
EP 94 40 2879

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.6)
A	EP-A-0 541 340 (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.) * le document en entier * ---	1,9,13	C07H21/00 B01J19/00
A	EP-A-0 130 739 (CHIRON CORPORATION) * abrégé * * figures 1,2 * ---	1,9,13	
A	EP-A-0 375 278 (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.) * abrégé * ---	1,9,13	
A	EP-A-0 114 599 (GESELLSCHAFT FUR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH) * abrégé * * revendications 1-6 * ---	1,9,13	
A	EP-A-0 181 491 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AND CO.) * le document en entier * ---	1,9,13	
A	WO-A-85 01224 (H.SANEII) * abrégé * * revendication 1 * ---	1,9,13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.6)
A	WO-A-91 17823 (PROTOS CORPORATION) * abrégé * ---	1,9,13	C07H B01J
A	WO-A-92 02535 (APPLIAD BIOSYSTEMS, INC.) * le document en entier * -----	1,9,13	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche <b>LA HAYE</b>		Date d'achèvement de la recherche <b>26 Janvier 1995</b>	Examinateur <b>Scott, J</b>
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique D : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 (1.12.94) (P4/C02)